

(12)

**DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(21) Numéro de dépôt: 89420054.2

(51) Int. Cl.4: **B 01 L 3/00**  
**C 12 M 1/16**

(22) Date de dépôt: 15.02.89

(30) Priorité: 16.02.88 FR 8802180

(43) Date de publication de la demande:  
23.08.89 Bulletin 89/34

(84) Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: **API SYSTEM S.A.**  
**La Balme Les Grottes**  
**F-38390 Montalieu-Vercieu (FR)**

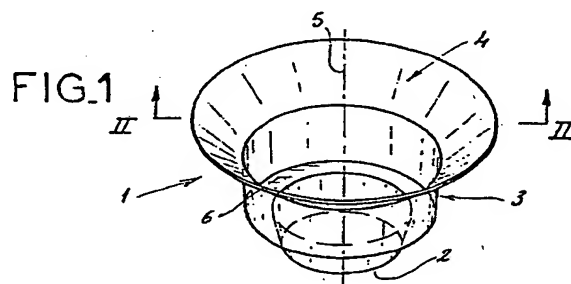
(72) Inventeur: **Monget, Daniel**  
**24 Résidence du Moulin**  
**Saint-Sorlin-en-Bugey F-01150 Lagnieu (FR)**

(74) Mandataire: **Maureau, Philippe et al**  
**Cabinet GERMAIN & MAUREAU BP 3011**  
**F-69392 Lyon Cédex 03 (FR)**

(54) **Cupule d'analyse microbiologique ou similaire.**

(57) La présente invention concerne une cupule (1) d'analyse microbiologique ou similaire du type comportant un fond plat (2), une paroi (3) de section circulaire raccordée à ce fond plat (2) et une extrémité ouverte (4), caractérisée en ce qu'à partir du fond plat (2) la paroi (3) de la cupule (1) présente trois zones tronconiques superposées  $Z_1$ ,  $Z_2$  et  $Z_3$ , dont les diamètres de base ( $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ) respectifs sont croissants du fond plat (2) vers l'extrémité ouverte (4).

Cette cupule permet de travailler avec de très faibles volumes de suspension bactérienne pour des courtes durées d'incubation. Il s'agit d'une solution très rentable au niveau économique qui donne des résultats précis et reproductibles.



**EP 0 329 579 A1**

## Description

## CUPULE D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE OU SIMILAIRE

La présente invention concerne une cupule d'analyse microbiologique ou similaire du type comportant un fond plat, une paroi de section circulaire raccordée à ce fond plat et une extrémité ouverte.

Un tel type de cupule est employé dans certaines méthodes d'analyse, utilisées notamment à des fins de diagnostic rapide par identification, ou de détermination de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) pour une souche bactérienne donnée. Ces méthodes sont déjà mises en oeuvre de façon standardisée dans certains laboratoires, à l'aide de plaques rectangulaires en matière synthétique et thermoformées, présentant une forme allongée et pourvues chacune, d'une ou de deux rangées de petites cupules tronconiques à fond plat constituant des tubes à essais miniaturisés. Chacune des cupules est initialement remplie soit d'un substrat de croissance déshydraté différent associé à un révélateur chimique approprié de consommation du substrat, soit d'un même antibiotique déshydraté à des concentrations différentes ou d'un antibiotique déshydraté différent.

Ces méthodes impliquent ensuite une opération d'ensemencement ou d'inoculation par introduction d'un volume donné de suspension aqueuse d'une souche microbienne dans chaque cupule. Suite à cette opération, les cupules sont mises à l'étuve pour une phase de croissance qui dure vingt-quatre heures.

Dans le cadre d'une identification bactérienne, la consommation du substrat propre à chaque cupule par la souche est visualisée par l'intermédiaire du révélateur chimique qui change la coloration du milieu de culture contenu dans la cupule. La lecture des colorations des différentes cupules se fait visuellement ou de préférence automatiquement par l'intermédiaire d'un photomètre équipé d'un passeur de filtres mesurant la lumière transmise par la suspension. L'utilisation par la souche inconnue des différents substrats des cupules de la plaque permet l'identification biochimique de la souche.

Dans le cadre de la détermination de la sensibilité d'une souche donnée aux antibiotiques, les résultats sont lus au moyen d'un photomètre mesurant par turbidimétrie le rapport de la lumière diffusée sur la lumière transmise par la suspension. La turbidité est maximale, lorsque la souche considérée est insensible à l'antibiotique testé et se développe normalement dans le milieu de culture.

Les photomètres utilisés dans les deux cas comportent une source lumineuse localisée au-dessus de la cupule concernée émettant un faisceau lumineux incident perpendiculaire au fond plat de la cupule et trois diodes réceptrices dont l'une mesurant la lumière transmise est disposée directement au-dessous du fond plat, les deux autres diodes mesurant la lumière diffusée et décalées chacune d'environ 30° par rapport à celle mesurant la lumière transmise sont disposées en regard de la paroi de la cupule tronconique considérée.

Dans une première forme de réalisation actuellement connue, les cupules d'analyse présentent un fond plat raccordé à une paroi latérale leur conférant une configuration tronconique. En ce qui concerne leurs dimensions, elles possèdent un diamètre de base important et une hauteur faible. Le volume de suspension contenu dans chacune de celles-ci est d'environ 135 µl et la durée d'incubation en étuve nécessaire est de vingt-quatre heures.

Cette durée importante nuit à la rentabilité économique de ce type d'analyse microbiologique.

Compte-tenu de cela, il a été imaginé dans une seconde forme de réalisation connue de diminuer le diamètre de ces cupules tronconiques. Ainsi le trajet optique parcouru par le rayon lumineux incident du photomètre au-travers de la suspension bactérienne est, pour un même volume de 135 µl, plus long, ce qui a pour effet d'augmenter la sensibilité du photomètre de lecture et donc de permettre des mesures optiques fiables sur des suspensions bactériennes à faible durée de croissance, plus précisément quatre heures, pour lesquelles la révélation des réactions considérées n'est encore que naissante.

Il est à noter que le volume de suspension bactérienne contenue dans chacune de ces cupules reste cependant important, de l'ordre de 135 µl. Or, les galeries d'identification de souches et d'antibiogramme peuvent nécessiter jusqu'à trente-deux cupules, ce qui équivaut à un volume important de suspension bactérienne (six millilitres environ avec le volume mort) et donc à un nombre élevé de colonies nécessaires pour obtenir la suspension.

On sait, par ailleurs, que, lors d'une analyse microbiologique, le nombre de colonies bactériennes isolées à prélever doit être le plus faible possible. Ceci est dû, d'une part, au nombre limité de colonies disponibles pour un germe donné et, d'autre part, au risque de mélange bactérien au cours du prélèvement. Néanmoins, le taux de germes doit être suffisant pour obtenir une opacité standard des suspensions, indispensable pour garantir des résultats précis à la lecture.

Il est clair que des volumes importants de suspension bactérienne par cupule sont tout à fait incompatibles avec les contraintes de la pratique.

Compte-tenu de cela, il était donc nécessaire de mettre au point une cupule d'analyse contenant un faible volume de suspension bactérienne et offrant un trajet optique relativement long au rayon lumineux incident du photomètre afin de réduire la durée de la phase d'incubation à quatre heures.

Le problème technique alors rencontré fut lié aux phénomènes de tension de surface de la suspension. En effet, un volume très faible de suspension introduit dans une cupule se présente sous la forme d'une gouttelette dont la cohésion est importante et qui, par conséquent, se moule difficilement à la forme définie par la paroi et le fond des cupules tronconiques connues. Ceci a pour conséquence que la gouttelette peut se fixer dans différentes

positions sur la paroi de la cupule du fait de la mouillabilité faible de celle-ci.

Son ménisque ne se trouve donc pratiquement jamais sensiblement compris dans un plan parallèle au fond de la cupule. De plus, même dans l'hypothèse la plus favorable de positionnement du ménisque, celui-ci est instable et évolue constamment d'une forme concave à une forme convexe ou inversement.

Ainsi, les résultats obtenus lors de la lecture colorimétrique ou turbidimétrique au-travers de telles cupules sont imprécis et faux. De plus, la reproductibilité des résultats obtenus n'est absolument pas assurée. A cela s'ajoute encore le fait que la variabilité de la forme du ménisque d'une cupule à une autre risque de fausser le résultat global de l'analyse.

Face à ces problèmes, la Demanderesse a engagé des recherches approfondies et de nombreux essais qui ont permis d'aboutir à une cupule tout à fait originale dans sa forme, permettant de remédier aux inconvénients et aux lacunes précitées, capable de garantir des mesures photométriques fiables et reproductibles en vue d'analyses microbiologiques correctes et ne nécessitant qu'un faible volume de suspension bactérienne et une courte durée d'incubation.

A cet effet, la cupule d'analyse microbiologique ou similaire, objet de l'invention, qui est du type comportant un fond plat, une paroi de section circulaire raccordée à ce fond plat et une extrémité ouverte, est caractérisée en ce qu'à partir du fond plat la paroi de la cupule présente au moins deux zones tronconiques superposées  $Z_1$  et  $Z_2$ , dont les diamètres de base respectifs sont croissants du fond plat vers l'extrémité ouverte, et en ce que la première zone tronconique  $Z_1$  de la cupule comportant le fond plat est raccordée à la seconde zone tronconique  $Z_2$  par un bord annulaire compris dans un plan parallèle au fond plat dont le diamètre extérieur correspond au diamètre de base de la seconde zone tronconique  $Z_2$  de la cupule.

Dans cette cupule, le ménisque obtenu pour des faibles volumes de suspension bactérienne est relativement plat, c'est-à-dire sensiblement parallèle au fond de la cupule. Le bord annulaire de la cupule assure une bonne assise du ménisque et garantit ainsi sa stabilité dans le temps autorisant une bonne précision et une bonne reproductibilité des mesures photométriques.

Dans une forme préférée d'exécution, cette cupule comporte une troisième zone tronconique évasée  $Z_3$  raccordée à la deuxième zone tronconique  $Z_2$  et prolongeant celle-ci jusqu'à l'extrémité ouverte, le diamètre de base de cette troisième zone tronconique  $Z_3$  correspondant au diamètre supérieur de cette deuxième zone tronconique  $Z_2$ .

Selon un exemple non limitatif et intéressant, les hauteurs de la première zone tronconique  $Z_1$ , de la deuxième zone tronconique  $Z_2$  et de la troisième zone tronconique sont respectivement de l'ordre de 20 %, 50 % et 30 % de la hauteur totale de la cupule, tandis que le diamètre de base de la première zone tronconique  $Z_1$ , la différence entre le diamètre extérieur et le diamètre intérieur du bord

annulaire et le diamètre de base de la troisième zone tronconique  $Z_3$  ont des longueurs respectivement égales à environ 43 %, 7 % et 69 % du diamètre supérieur de la troisième zone tronconique.

L'important évasement que constitue la troisième zone tronconique de la cupule facilite l'introduction de la suspension bactérienne et des réactifs, permet la mise en place d'huile ou de paraffine pour placer le milieu en anaérobiose, et enfin favorise le centrage des cupules lors de leur gerbage les unes sur les autres en vue du stockage ou du conditionnement ou lors de leur mise en place sur le support du photomètre. Par ailleurs, du fait de la concentration des couleurs sur une surface réduite délimitée par la deuxième zone tronconique  $Z_2$ , la lecture visuelle des réactions colorées est rendue plus aisée.

Afin de faciliter le démoulage de la cupule lors de sa fabrication, l'angle d'inclinaison de la paroi dans la zone tronconique  $Z_1$  par rapport à un plan perpendiculaire au plan comprenant le fond plat est supérieur à celui de la paroi dans la zone tronconique  $Z_2$  et inférieur à celui de la paroi dans la zone tronconique  $Z_3$ .

Conformément à une variante d'exécution de l'invention, la cupule présente une deuxième zone tronconique  $Z_2$  prolongée vers l'extérieur au niveau de son extrémité ouverte par un rebord annulaire compris dans un plan parallèle au fond plat.

La présente invention concerne également une plaque rectangulaire de forme allongée apte à servir de support aux cupules, et dont le plan supérieur est raccordé aux bords des extrémités ouvertes des cupules qu'elle comporte.

De toute façon, l'invention sera mieux comprise à l'aide de la description qui suit, en référence au dessin schématique annexé représentant à titre d'exemples non limitatifs, deux formes d'exécution de cette cupule d'analyse microbiologique ou similaire :

Figure 1 est une vue en perspective de la cupule selon l'invention;

Figure 2 est une vue en coupe diamétrale selon II-II de figure 1,

Figure 3 est une vue en coupe diamétrale d'une variante d'exécution de cette cupule;

Figure 4 est une vue en perspective d'une plaque d'analyses microbiologiques ou similaires comportant des cupules selon l'invention.

La cupule 1 représentée aux figures 1 et 2 est un récipient comportant un fond plat 2, une paroi 3 et une extrémité ouverte 4. Sa configuration est symétrique par rapport à son axe médian 5.

La paroi 3 possède une section transversale circulaire. Comme le montre la figure 2, elle présente, à partir du fond plat 2, trois zones tronconiques  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  de dimensions différentes. Leurs diamètres de base respectifs  $d_1$ ,  $d_2$  et  $d_3$  sont croissants du fond plat 2 vers l'extrémité ouverte 4.

La première zone tronconique  $Z_1$  de la paroi 3 est reliée à la deuxième zone tronconique  $Z_2$  par l'intermédiaire d'un bord annulaire 6 plat compris dans un plan parallèle au fond plat 2. Le diamètre extérieur de ce bord annulaire 6 correspond au diamètre de base  $d_2$  de la deuxième zone tronconique  $Z_2$  de la paroi 3.

Cette deuxième zone tronconique  $Z_2$  est raccordée à la troisième zone tronconique  $Z_3$  évasée qui la prolonge jusqu'à l'extrémité ouverte 4 de la cupule 1. Le diamètre de base  $d_3$  de cette troisième zone tronconique  $Z_3$  correspond au diamètre supérieur de cette deuxième zone tronconique  $Z_2$ .

La paroi 3 au niveau de la première zone tronconique  $Z_1$  forme un angle  $\alpha$  avec un plan perpendiculaire au fond plat 2 d'une valeur supérieure à celle d'un angle  $\beta$  existant entre la paroi 3 au niveau de la deuxième zone tronconique  $Z_2$  et un plan vertical perpendiculaire au bord annulaire 6 et inférieure à celle d'un angle  $\gamma$  formé entre un plan vertical perpendiculaire à celui comprenant le fond plat 2 et la paroi 3 dans la troisième zone tronconique  $Z_3$ .

Le ménisque 7 de la suspension bactérienne représenté en pointillés sur la figure 2 est relativement plat et parallèle au fond plat 2 du fait du bord annulaire 6 qui assure son assise et du fait des inclinaisons différentes de la paroi 3 dans les zones tronconiques  $Z_1$ ,  $Z_2$  et  $Z_3$  par rapport à la verticale.

De façon exemplative et non limitative, les dimensions relatives des différentes zones tronconiques de la paroi 3 et de la cupule 1 ont été déterminées comme suit la hauteur totale de la cupule 1 étant désignée par H, les hauteurs  $h_1$ ,  $h_2$ ,  $h_3$  des zones tronconiques  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  correspondantes représentent respectivement environ 21 %, 48 % et 31 % de la hauteur totale H de la cupule 1.

Concernant les diamètres des différentes zones  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  si on considère le diamètre supérieur D de la troisième zone tronconique  $Z_3$ , c'est-à-dire de l'extrémité ouverte 4, le diamètre de base  $d_1$  de la première zone tronconique  $Z_1$  a une longueur représentant environ 45 % de celle de D, la différence entre le diamètre extérieur  $d_2$  et le diamètre intérieur du bord annulaire 6 a une longueur représentant environ 7 % de celle de D et enfin le diamètre de base  $d_3$  de la troisième zone tronconique a une longueur représentant environ 69 % de celle de D.

De façon plus précise, une cupule selon l'invention peut présenter les dimensions suivantes :

$H \approx 5 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$	$D \approx 9,5 \text{ mm}$
$h_1 \approx 1 \text{ mm}$	$d_1 \approx 4,1 \text{ mm}$
$h_2 \approx 2,5 \text{ mm}$	$d_2 \approx 6 \text{ mm}$
$h_3 \approx 1,5 \text{ mm}$	$d_3 \approx 6,6 \text{ mm}$

Le volume contenu par cupule peut, dans cet exemple, varier de 50  $\mu\text{l}$  à 60  $\mu\text{l}$ .

Pour des contenances par cupule différentes, les dimensions varieront selon les normes définies ci-dessus.

Une variante d'exécution de l'invention est représentée à la figure 3 du dessin dans laquelle les mêmes éléments seront désignés par les mêmes références que précédemment. La cupule 1 considérée comporte également un fond plat 2 relié à une paroi 3 de section transversale circulaire se terminant par une extrémité ouverte 4. La cupule 1 est symétrique par rapport à l'axe médian 5.

La paroi 3 présente uniquement, à partir du fond

plat 2, deux zones tronconiques  $Z_1$ ,  $Z_2$  raccordées l'une à l'autre par un bord annulaire 6 compris dans un plan parallèle au fond plat 2 et identiques dans leurs formes et leurs dimensions relatives à celles décrites précédemment pour la cupule selon le mode préférentiel d'exécution.

Le bord supérieur de la deuxième zone tronconique  $Z_2$  délimitant l'extrémité ouverte 4 de la cupule 1 est prolongé par un bord annulaire 8 dirigé vers l'extérieur de la cupule 1 et compris dans un plan parallèle au fond plat 2. Ce rebord annulaire 8 constitue une cassure au niveau de la deuxième zone tronconique  $Z_2$  de la paroi 3 stabilisant le ménisque 7 de la suspension bactérienne contenue dans les deux zones tronconiques  $Z_1$  et  $Z_2$  de la paroi 3 de la cupule 1.

Il faut encore signaler que les cupules selon l'invention sont obtenues notamment par thermoformage d'un matériau synthétique.

En vue de l'utilisation de la cupule, il est prévu avantageusement une plaque-support de cupule, comme celle représentée à la figure 4. La plaque 10 présente une forme allongée rectangulaire. Elle est délimitée par des bords 11 formant partie d'appui. Ces bords 11 sont reliés au plan supérieur 12 de la plaque 10 par l'intermédiaire de parois 13 perpendiculaires à ceux-ci. Le plan supérieur 12 est parallèle au plan comprenant les bords 11 d'appui et est raccordé aux bords des extrémités ouvertes des cupules 1 selon l'invention, groupées en rangées, le nombre des cupules 1 représenté sur la figure 4 n'étant pas limitatif. Ces plaques-support 10 de cupules 1 d'analyse microbiologique sont classiquement obtenues par thermoformage d'un matériau synthétique approprié.

Comme il va de soi, l'invention n'est pas limitée aux exemples décrits ; elle embrasse, au contraire, toutes les variantes de réalisation équivalentes et basées sur le même principe.

## Revendications

1- Cupule (1) d'analyse microbiologique ou similaire du type comportant un fond plat (2), une paroi (3) de section circulaire raccordée à ce fond plat (2) et une extrémité ouverte (4), caractérisée en ce qu'à partir du fond plat (2) la paroi (3) de la cupule (1) présente au moins deux zones tronconiques superposées  $Z_1$  et  $Z_2$ , dont les diamètres de base ( $d_1, d_2$ ) respectifs sont croissants du fond plat (2) vers l'extrémité ouverte (4), et en ce que la première zone tronconique  $Z_1$  de la cupule (1) comportant le fond plat (2) est raccordée à la seconde zone tronconique  $Z_2$  par un bord annulaire (6) compris dans un plan parallèle au fond plat (2) dont le diamètre extérieur correspond au diamètre de base ( $d_2$ ) de la seconde zone tronconique  $Z_2$  de la cupule (1).

2- Cupule (1) selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte une troisième zone tronconique évasée  $Z_3$  raccordée à la deuxième zone tronconique  $Z_2$  et prolongeant celle-ci jusqu'à l'extrémité ouverte (4), le

diamètre de base de cette troisième zone tronconique  $Z_3$  correspondant au diamètre supérieur ( $d_3$ ) de cette deuxième zone tronconique  $Z_2$ .

3- Cupule (1) selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que les hauteurs ( $h_1$ ,  $h_2$ ,  $h_3$ ) de la première zone tronconique  $Z_1$ , de la deuxième zone tronconique  $Z_2$  et de la troisième zone tronconique sont respectivement de l'ordre de 20 %, 50 % et 30 % de la hauteur totale (H) de la cupule (1), tandis que le diamètre de base ( $d_1$ ) de la première zone tronconique  $Z_1$ , la différence entre le diamètre extérieur ( $d_2$ ) et le diamètre intérieur du bord annulaire (6) et le diamètre de base ( $d_3$ ) de la troisième zone tronconique  $Z_3$  ont des longueurs respectivement égales à environ 43 %, 7 % et 69 % du diamètre supérieur de la troisième zone tronconique.

4- Cupule (1) selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'angle d'inclinaison ( $\alpha$ ) de la paroi (3) dans la

zone tronconique  $Z_1$  par rapport à un plan perpendiculaire au plan comprenant le fond plat (2) est supérieur à celui ( $\beta$ ) de la paroi (3) dans la zone tronconique  $Z_2$  et inférieur à celui ( $\gamma$ ) de la paroi (3) dans la zone tronconique  $Z_3$ .

5- Cupule (1) selon la revendication 1, caractérisée en ce que la cupule (1) présente une deuxième zone tronconique  $Z_2$  prolongée vers l'extérieur au niveau de son extrémité ouverte (4) par un rebord annulaire (8) compris dans un plan parallèle au fond plat (2).

6- Plaque (10) d'analyse microbiologique ou similaire présentant une forme allongée rectangulaire des bords d'appui (11) reliés au plan supérieur (12) par l'intermédiaire de parois (3) perpendiculaires à ceux-ci, caractérisée en ce qu'elle est apte à servir de support aux cupules (1) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et en ce que son plan supérieur est raccordé aux bords des extrémités ouvertes des cupules qu'elle comporte.

25

30

35

40

45

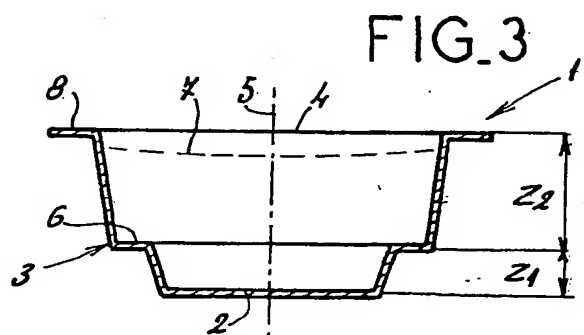
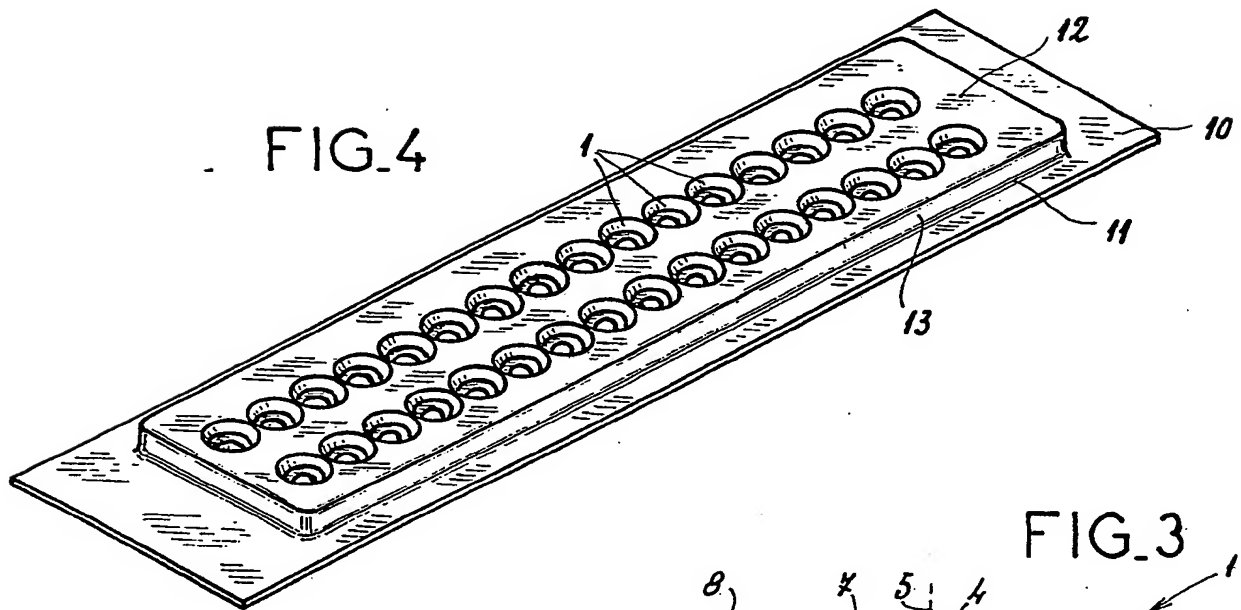
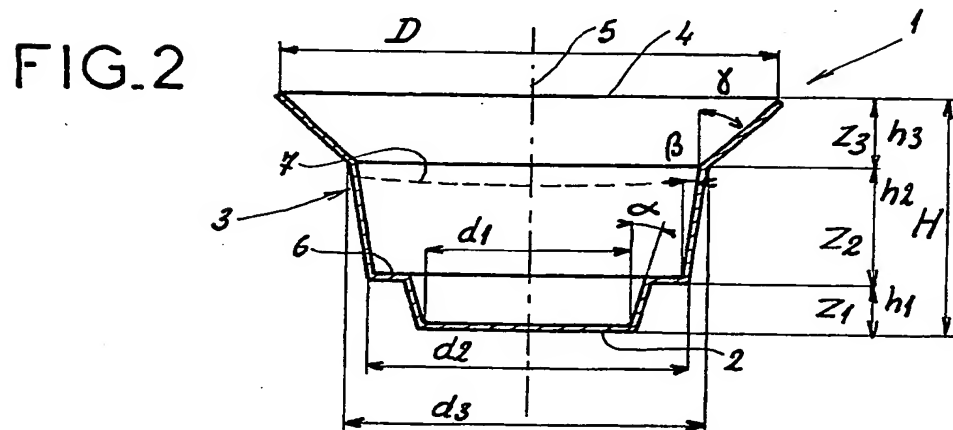
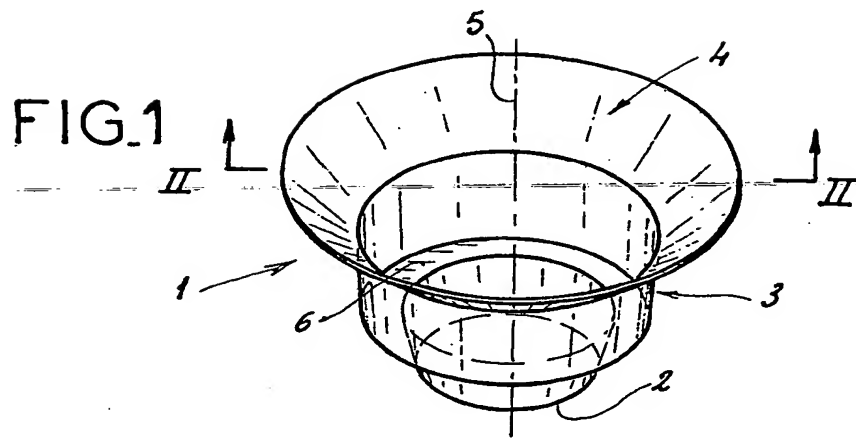
50

55

60

65

5





Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 89 42 0054

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X	EP-A-0 050 018 (OLYMPUS) * Revendications 1,10; figures 1,7 * ---	1,4,6	B 01 L 3/00 C 12 M 1/16
X	GB-A-1 493 353 (McDONNELL DOUGLAS) * Revendications 1,12; figure 2 * ---	1,6	
X	US-A-3 713 780 (S. SHAPIRO) * Figures 1-4; résumé * ---	1	
A	US-A-3 363 503 (N. SHIFRIN) -----		
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
			C 12 M B 01 L G 01 N
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 14-04-1989	Examineur COUCKE A.O.M.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 150 03.82 (10402)